

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 633.14:631.523.11:577.175.132

Молекулярный анализ генов сигнального пути гиббереллинов у ржи посевной (*Secale cereale* L.)**М.С. Баженов¹, А.Г. Черноок¹, М.Г. Дивашук^{1,2,*}**

¹Лаборатория прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42;

²Центр молекулярной биотехнологии, Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49

*e-mail: divashuk@gmail.com

Гены сигнального пути гиббереллинов, кодирующие DELLA-белок и рецептор гиббереллинов GID1, были секвенированы у нескольких сортов (Альфа, Валдай, Орловская 9, Прача) и одной линии ржи (ЕМ-1) с применением методов нового поколения. Выявленные в результате несколько аллелей этих генов различаются преимущественно однонуклеотидными полиморфизмами, реже – инсерциями и делециями. Большая часть обнаруженных мутаций оказались синонимичными либо приходящимися на некодирующие регионы генов. Изменения в аминокислотной последовательности белков, связанные с прочими мутациями, вероятно, являются функционально-нейтральными. Мутации, аналогичные пшеничным аллелям гиббереллин-нечувствительной короткостебельности, обнаружены не были.

Ключевые слова: *Secale cereale*, рожь, гиббереллины, короткостебельность, гены, DELLA, секвенирование

Рожь – хлебная зерновая и кормовая сельскохозяйственная культура, широко возделываемая на севере Европы и дающая хорошие урожаи зерна даже на бедных песчаных почвах [1]. Одной из проблем выращивания ржи является ее высокорослость, которая может приводить к полеганию посевов и частичной потере урожая. Основным способом борьбы с полеганием является создание короткостебельных сортов, обладающих прочной соломиной.

Гиббереллины – растительные гормоны, регулирующие рост стеблей и листьев за счет деления и растяжения клеток, а также такие этапы развития, как покой семян и почек, переход к цветению, созревание пыльцы [2]. В 60-е гг. XX в. использование в селекции пшеницы мутантных аллелей генов, обуславливающих нечувствительность роста растений к гиббереллинам, позволило создавать короткостебельные, устойчивые к полеганию, высокоурожайные сорта, пригодные для выращивания при орошении и внесении высоких доз удобрений, что впоследствии было названо «зеленой революцией» в сельском хозяйстве [3]. Гены, обуславливающие гиббереллин-нечувствительную короткостебельность пшеницы, локализованные на хромосомах 4В и 4D, были обозначены как *Rht1* (*Reduced height 1*) и *Rht2* (впоследствии – *Rht-B1b* и *Rht-D1b*) [4]. Также у этой зерновой культуры известно большое число других генов короткостебельности, не связанных с чувствительностью

к гиббереллинам, однако многие из них заметно снижают продуктивность растений и поэтому не используются в создании сортов.

С молекулярно-биологической точки зрения механизм гиббереллин-нечувствительной короткостебельности пшеницы, обусловленной генами *Rht-1*, представляется следующим: ген *Rht-1* кодирует белок DELLA, который связывается с транскрипционными факторами, играя роль коактиватора или корепрессора, и подавляет рост клеток [5, 6]. В норме, в присутствии активных форм гиббереллинов, белок DELLA связывается с белком-рецептором гиббереллинов – GID1 (*Gibberellin-Insensitive Dwarf 1*), а затем подвергается убиквитинированию и протеасомной деградации. Отсутствие белков DELLA приводит к активизации ростовых процессов. Белки DELLA содержат в себе два основных домена – N-концевой домен, участвующий во взаимодействии с GID1 и содержащий консервативные аминокислотные мотивы DELLA и VHYNP, а также домен GRAS, обладающий трансактивационной, репрессивной и регуляторной активностью [7, 8]. Структура белка GID1 сходна со структурой белков семейства гормон-чувствительных липаз и имеет альфа-бета-гидролазную укладку полипептидной цепи. Наиболее значимыми для функционирования GID1 являются аминокислотные остатки, формирующие субстрат-связывающий центр белка [8]. Мутации *Rht-B1b* и *Rht-D1b* приводят к появлению

белков DELLA, не способных связываться с белком *GID1*, но сохраняющих функцию репрессора сигнала гиббереллинов [9]. Таким образом, снижение высоты растения, связанное с нарушением сигнального пути гиббереллинов, возможно как за счет повышения стабильности белков DELLA, так и за счет потери функции *GID1*.

Использование короткостебельных мутантов в селекции ржи началось несколько позже. Ген доминантной гиббереллин-чувствительной короткостебельности *Hl* (*Humilis*), позднее названный *Ddw1* (*Dominant dwarf 1*), был впервые изучен В.Д. Кобылянским в 1972 г. у естественного мутанта ржи ЕМ-1. Этот ген, локализованный на хромосоме 5R, является наиболее широко используемым в современных сортах [10]. Недавние исследования показали, что ген *Ddw1* связан с повышенной активностью фермента гиббереллин-2-оксидазы, участвующего в деградации активных форм гиббереллинов [11]. Помимо 4 доминантных генов *Ddw1* – *Ddw4* [12] у ржи известен ряд рецессивных генов *dw1* – *dw9* [13], а также гены «compactum» – *ct1* и *ct2*. К гиббереллин-нечувствительным у ржи относятся гены *ct1*, *ct2*, *dw6* (аллель *ct2*) [10] и *dw9* [13], однако вопрос об их гомологии с пшеничными генами *Rht-1* или другими известными генами сигнального пути гиббереллинов остается открытым.

Несмотря на очевидность необходимости изучения аллельного разнообразия генов сигнального пути гиббереллинов ржи, гомологичных пшеничным генам *Rht-1* и *Gid1*, подобные исследования еще не проводились. Целью нашей работы стало проведение такого исследования.

Материалы и методы

Растительный материал. В качестве материала для секвенирования были выбраны короткостебельные сорта и линии ржи – сорт Альфа (рецессивно-полигенная короткостебельность), Валдай (рецессивно-полигенная короткостебельность), Орловская 9 (ген *Ddw2*), Прача (ген *Ddw1*), линия ЕМ-1 (*Ddw1*). Семена сортов Альфа и Валдай были предоставлены кафедрой генетики, селекции и семеноводства РГАУ–МСХА имени К.А. Тимирязева, семена сортов Орловская 9 и Прача – Всероссийским институтом генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, линия ЕМ-1 – Национальной коллекцией мелкосемянных зерновых культур США (National Small Grains Collection).

Выделение ДНК и ПЦР. ДНК выделяли традиционным методом с использованием бромида цетилтриметиламмония из высушенных листьев [14]. Для выделения ДНК, ПЦР и секвенирования использовались по два индивидуальных растения от каждого образца ржи (двукратная биологическая повторность).

Праймеры для ПЦР были подобраны и использованы ресурса Primer-BLAST NCBI и син-

тезированы в ООО «Синтол». Для амплификации гена, гомологичного пшеничному гену *Rht1*, у ржи использовались праймеры ScRht1-F: 5'-CGAGGCCAGCAAAGCTTG-3', ScRht1-R: 5'-GGGGTTGTGTTGTCCTCCAT-3'; для гена ржаного гена *Gid1* – праймеры ScGid1-F: 5'-CATCCAAGACCGTCCAAAACAAT-3', ScGid1-R: 5'-GGCAAACACATGGATGGATACAG-3'. Для подбора праймеров использовались последовательности контигов генома ржи Lo7, найденные с помощью алгоритма BLAST на основе последовательностей генов *Rht-1* и *Gid1* пшеницы [15, 16].

ПЦР-смесь состояла из следующих компонентов (даны концентрации компонентов в конечной смеси): 1 × LR Plus буфер pH 9,3 (ООО «Силекс»), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM каждого dNTP, 2 мкМ каждого праймера, 0,04 ед./мкл LR Plus-полимеразы, 0,02 ед./мкл Taq-полимеразы, 4 нг/мкл матричной ДНК. Объем ПЦР-смеси составлял 25 мкл. ПЦР проводилась при следующих температурных условиях: 94°C – 5 мин; 36 циклов 94°C – 30 с, 58°C – 30 с, 72°C – 2 мин; 72°C – 5 мин. Полученные ПЦР-продукты анализировали методом электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле с буфером TBE с добавлением бромистого этидия. Визуализация электрофореграмм проводилась в ультрафиолетовом свете с использованием системы гель-документирования [17].

Секвенирование и обработка данных. ПЦР-продукты, после проверки их качества с помощью электрофореза, были секвенированы с использованием метода NGS. Секвенирование на платформе MiSeq Illumina было проведено в ООО «Геномед». ДНК-библиотеки были подготовлены с помощью набора реактивов Swift 2S™ Turbo DNA Library Kits (Swift Biosciences, США). В процессе подготовки ДНК-библиотеки ПЦР-продукты, полученные от разных образцов ржи, метили индивидуальными баркодами. После разделения прочтений по баркодам результаты секвенирования были получены по каждому образцу в отдельности [17].

Для сборки полной последовательности гена из коротких прочтений нами была собрана цепочка программ, действующая по принципу сборки *de novo* с использованием референса [18]: SPAdes 3.14.0 – для сборки контигов [19]; CAP3 – для выбора контигов, соответствующих референсу, и их сборки в суперконтиги [20]; SNAP (Scalable Nucleotide Alignment Program) v1.0 [21], freebayes [22], samtools 1.10, bcftools 1.10.2 [23] – для картирования прочтений на суперконтиги, исправления неточностей сборки, выявления аллельных вариантов на случай гетерозиготности растения.

Полученные последовательности генов различных образцов ржи были выравнены с помощью GeneDoc v2.7 [24]. Границы белок-кодирующей последовательности были установлены путем выравнивания на соответствующие последова-

тельности генов-гомологов у пшеницы мягкой. Трансляция в аминокислотную последовательность также выполнена в GeneDoc. Предсказание функциональной значимости аминокислотных замен выполнено с помощью онлайн-сервиса PROVEAN [25]. Положение доменов белков предсказано с помощью поиска консервативных доменов NCBI [26].

Результаты и обсуждение

Секвенирование ПЦР-продуктов (ожидаемый размер 1968 и 2576 п. о. для генов *ScRht1* и *ScGid1* соответственно), включающих полные последовательности генов, с применением методов нового поколения позволило выявить полиморфизмы не только при сравнении сортов и отдельных растений, но и при сравнении аллельных вариантов в пределах одного гетерозиготного растения. Это особенно актуально для ржи, которая является перекрестноопыляемой сельскохозяйственной культурой. Суммарно нами было выявлено 47 полиморфизмов в гене *ScRht1* и 49 в гене *ScGid1* (рисунок, А).

Мы выявили 9 аллелей гена-гомолога *Rht1* (*Della*), различающихся преимущественно однонуклеотидными полиморфизмами. Делеция, обнаруженная в одном из аллелей гетерозиготного растения сорта ржи Альфа, приводит к потере двух остатков глицина в позициях 15 и 16 в полиглициновом районе вблизи N-конца белка (рисунок, Б). У сорта Прача в одном из аллелей гетерозиготного растения была обнаружена аминокислотная замена V368I, приходящаяся на GRAS-домен белка. Большая же часть обнаруженных нами полиморфизмов представляла собой синонимичные замены. Все описанные здесь изменения аминокислотной последовательности белка с большой

вероятностью являются функционально нейтральными по результатам анализа с помощью алгоритма PROVEAN [25].

Ген *Gid1* был секвенирован аналогичным способом у тех же сортов и линий ржи. Обнаруженные в результате секвенирования многочисленные полиморфизмы, включая инсерции и делеции, приходятся в основном на единственный интрон или на промотор гена. Всего было обнаружено 9 аллельных вариантов. Кодировочная часть гена содержит только однонуклеотидные мутации, большая часть которых не приводит к изменению аминокислотной последовательности белка. Несинонимичные мутации были обнаружены только в гетерозиготном состоянии у сорта Прача (M49I) и линии EM1 (R181Q) (рисунок, Б). Данные аминокислотные замены, скорее всего, являются функционально-нейтральными (PROVEAN score $-0,543...+0,380$).

Таким образом, нам удалось выявить достаточно большое число аллелей генов сигнального пути гиббереллинов у ржи. Многие мутации находились в гетерозиготном состоянии, что отражает перекрестный характер опыления этой сельскохозяйственной культуры вместе с внутрисортным разнообразием. Однако большая часть найденных полиморфизмов оказалась «молчащими мутациями», что является проявлением функциональности генов и их значимости для роста и развития растений вместе с давлением естественного и искусственного отборов, «выбраковывающих» нежелательные мутации. Для каждого из генов нами было выявлено лишь по 3 изоформы белков, различающихся аминокислотной последовательностью. Однако у ржи не было выявлено достаточно масштабных изменений, которые могли бы привести к нарушению функции этих белков, или аналогич-

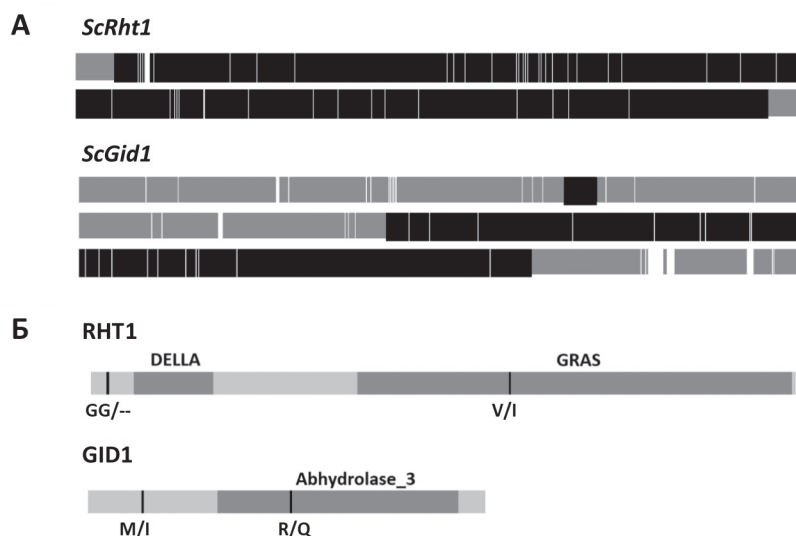


Рисунок. А. Сжатое выравнивание секвенированных последовательностей генов *ScRht1* и *ScGid1*. Белые вертикальные полосы отражают положения полиморфизмов. Черным цветом выделены экзоны генов. **Б.** Места предсказуемых аминокислотных замен в белках DELLA (RHT1) и GID1 ржи (показаны черными полосками). Темно-серым цветом выделены консервативные домены белков.

ных тем, что имеются у гиббереллин-нечувствительных короткостебельных мутантов пшеницы.

Несмотря на довольно большой успех использования гиббереллин-нечувствительных мутаций у пшеницы, среди сортов ржи такой тип короткостебельности распространен мало, что частично подтверждается и результатами нашего исследования. В связи с этим можно предположить, что такие мутации у ржи оказывают существенное негативное плейотропное действие на продуктивность растений либо, в связи с относительно меньшей изученностью культуры, просто еще не были обнаружены.

Мы благодарны д.б.н. И.Г. Лоскутову — заведующему отделом генетических ресурсов овса,

ржи и ячменя Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, д.б.н. В.Д. Кобылянскому — почетному профессору Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, а также д.б.н. В.С. Рубец — профессору кафедры генетики, селекции и семеноводства РГАУ—МСХА имени К.А. Тимирязева за предоставленный растительный материал.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-76-20023). Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schlegel R.H.J. Rye: genetics, breeding, and cultivation. CRC Press, 2013. 382 pp.
2. Davière J.-M., Achard P. Gibberellin signaling in plants // *Development*. 2013. Vol. 140. N 6. P. 1147–1151.
3. Peng J., Richards D.E., Hartley N.M., Murphy G.P., Devos K.M., Flintham J.E., Beales J., Fish L.J., Worland A.J., Pelica F., Sudhakar D., Christou P., Snape J.W., Gale M.D., Harberd N.P. 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators // *Nature*. 1999. Vol. 400. N 6741. P. 256–261.
4. Pearce S., Saville R., Vaughan S.P., Chandler P.M., Wilhelm E.P., Sparks C.A., Al-Kaff N., Korolev A., Boulton M.I., Phillips A.L., Hedden P., Nicholson P., Thomas S.G. Molecular characterization of *Rht-1* dwarfing genes in hexaploid wheat // *Plant Physiol*. 2011. Vol. 157. N 4. P. 1820–1831.
5. Yoshida H., Hirano K., Sato T., Mitsuda N., Nomoto M., Maeo K., Koketsu E., Mitani R., Kawamura M., Ishiguro S., Tada Y., Ohme-Takagi M., Matsuoka M., Ueguchi-Tanaka M. DELLA protein functions as a transcriptional activator through the DNA binding of the indeterminate domain family proteins // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2014. Vol. 111. N 21. P. 7861–7866.
6. Li S., Tian Y., Wu K., Ye Y., Yu J., Zhang J., Liu Q., Hu M., Li H., Tong Y., Harberd N.P., Fu X. Modulating plant growth-metabolism coordination for sustainable agriculture // *Nature*. 2018. Vol. 560. N 7720. P. 595–600.
7. Hirsch S., Oldroyd G.E. GRAS-domain transcription factors that regulate plant development // *Plant Signal Behav.* 2009. Vol. 4. N 8. P. 698–700.
8. Ueguchi-Tanaka M., Nakajima M., Katoh E., Ohmiya H., Asano K., Saji S., Hongyu X., Ashikari M., Kitano H., Yamaguchi I., Matsuoka M. Molecular interactions of a soluble gibberellin receptor, *GID1*, with a rice DELLA protein, *SLR1*, and gibberellin // *Plant Cell*. 2007. Vol. 19. N 7. P. 2140–2155.
9. Fu X., Richards D.E., Ait-Ali T., Hynes L.W., Ougham H., Peng J., Harberd N.P. Gibberellin-mediated proteasome-dependent degradation of the barley DELLA protein *SLN1* repressor // *Plant Cell*. 2002. Vol. 14. N 12. P. 3191–3200.
10. Börner A., Plaschke J., Korzun V., Worland A.J. The relationships between the dwarfing genes of wheat and rye // *Euphytica*. 1996. Vol. 89. N 1. P. 69–75.
11. Braun E.-M., Tsvetkova N., Rotter B., Siekmann D., Schwefel K., Krezdorn N., Plieske J., Winter P., Melz G., Voylov A.V., Hackauf B. Gene expression profiling and fine mapping identifies a gibberellin 2-oxidase gene co-segregating with the dominant dwarfing gene *Ddw1* in rye (*Secale cereale* L.) // *Front. Plant Sci. Frontiers*. 2019. Vol. 10: 857.
12. Kantarek Z., Masojć P., Bienias A., Milczarski P. Identification of a novel, dominant dwarfing gene (*Ddw4*) and its effect on morphological traits of rye // *PLoS ONE*. 2018. Vol. 13. N 6: e0199335.
13. Grądzielewska A., Milczarski P., Molik K., Pawłowska E. Identification and mapping of a new recessive dwarfing gene *dw9* on the 6RL rye chromosome and its phenotypic effects // *PLOS ONE*. 2020. Vol. 15. N 3: e0229564.
14. Doyle P.J. DNA protocols for plants // *Molecular techniques in taxonomy* / Eds. G.M.Hewitt, A.W.B. Johnston, and J.P.W. Young. Berlin–Heidelberg: Springer, 1991. P. 283–293.
15. Bauer E., Schmutzer T., Barilar I., et al. Towards a whole-genome sequence for rye (*Secale cereale* L.) // *Plant J*. 2017. Vol. 89. N 5. P. 853–869.
16. IPK Rye blast server [Electronic resource]. URL: <https://webblast.ipk-gatersleben.de/ryeselect/> (accessed: 27.06.2020).
17. Razumova O.V., Bazhenov M.S., Nikitina E.A., Nazarova L.A., Romanov D.V., Chernook A.G., Sokolov P.A., Kuznetsova V.M., Semenov O.G., Karlov G.I., Kharchenko P.N., Divashuk M.G. Molecular analysis of gibberellin receptor gene *GID1* in *Dasypyrum villosum* and development of DNA marker for its identification // *RUDN J. Agron. Animal Ind.* 2020. Vol. 15. N 1. P. 62–85.
18. Lischer H.E.L., Shimizu K.K. Reference-guided de novo assembly approach improves genome reconstruction for related species // *BMC Bioinformatics*. 2017. Vol. 18. N 1. P. 474.
19. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing // *J. Comput. Biol.* 2012. Vol. 19. N 5. P. 455–477.
20. Huang X., Madan A. CAP3: A DNA sequence assembly program // *Genome Res*. 1999. Vol. 9. N 9. P. 868–877.
21. Zaharia M., Bolosky W.J., Curtis K., Fox A., Patterson D., Shenker S., Stoica I., Karp R.M., Sittler T. Faster and more accurate sequence alignment with SNAP // arXiv:1111.5572 [cs, q-bio]. 2011.

22. Garrison E., Marth G. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing // arXiv:1207.3907 [q-bio]. 2012.

23. Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R., 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The sequence alignment/map format and SAMtools // Bioinformatics. 2009. Vol. 25. N 16. P. 2078–2079.

24. Nicholas K.B., Nikolai H.B., Jr. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Pittsburgh Supercomputing Center's National Resource for Biomedical Supercomputing, 1997.

25. Choi Y., Chan A.P. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels // Bioinformatics. 2015. Vol. 31. N 16. P. 2745–2747.

26. NCBI Conserved Domain Search [Electronic resource]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> (accessed: 29.06.2020).

Поступила в редакцию 14.05.2020 г.

После доработки 30.06.2020 г.

Принята в печать 07.07.2020 г.

RESEARCH ARTICLE

Molecular analysis of the gibberellin signaling pathway genes in cultivated rye (*Secale cereale* L.)

M.S. Bazhenov¹, A.G. Chernook¹, M.G. Divashuk^{1,2,*}

¹Laboratory of Applied Genomics and Breeding of Agricultural Plants, All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Timiryazevskaya st. 42, Moscow, 127550, Russia;

²Center for Molecular Biotechnology, Russian State Agrarian University—Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Timiryazevskaya st. 49, Moscow, 127550, Russia;

*e-mail: divashuk@gmail.com

Gibberellin signaling pathway genes encoding the DELLA protein and gibberellin receptor *GID1* were sequenced in several varieties (Alpha, Valdai, Orlovskaya 9, Pracha) and one line of rye (EM-1) using next generation methods. The revealed multiple alleles of these genes differ mainly in single-nucleotide polymorphisms, and less frequently in insertions and deletions. Most of the detected mutations turned out to be synonymous or located in the non-coding regions of the genes. Changes in the amino acid sequences of proteins associated with other mutations are probably functionally neutral. Mutations similar to wheat reduced-height gibberellin-insensitive alleles were not detected.

Keywords: *Secale cereale*, rye, gibberellins, reduced height, genes, *DELLA*, sequencing

Сведения об авторах

Баженов Михаил Сергеевич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии. Тел.: 8-499-976-65-44; e-mail: mikhabazhenov@gmail.com

Черноок Анастасия Геннадиевна — мл. науч. сотр. лаборатории прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии. Тел.: 8-499-976-65-44; e-mail: irbis-sibri@yandex.ru

Дивашук Михаил Георгиевич — канд. биол. наук, вед. науч. сотр., зав. лаборатории прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений, Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии, доцент кафедры генетики, селекции и семеноводства Российского государственного аграрного университета — МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел.: 8-499-976-65-44; e-mail: divashuk@gmail.com